



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>A61K 31/70</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/39718</b>  (43) Date de publication internationale: 12 août 1999 (12.08.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00229</p> <p>(22) Date de dépôt international: 3 février 1999 (03.02.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/01237 3 février 1998 (03.02.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LABORA-TOIRES GOEMAR S.A. [FR/FR]; ZAC de la Madeleine, F-35400 Saint Malo (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): YVIN, Jean-Claude [FR/FR]; 3, rue Gabriel Desgrés, F-35400 Saint Malo (FR). CRUZ, Florence [FR/FR]; 7, rue de la Loutre, F-35400 Saint Malo (FR). DESCAMPS, Valérie [FR/FR]; 22, rue Yan d'Argent, F-29680 Roscoff (FR). RICHARD, Christophe [FR/FR]; Kernevez, F-29400 Plougourvest (FR). THIBAL, Vesna [HR/FR]; 5, rue Gentille, F-69002 Lyon (FR). ARRIGO, Patrick [FR/FR]; Jussy, F-74930 Pers-Jussy (FR). CLOAREC, Bernard [FR/FR]; 81, rue de la Rive, F-29250 Saint Pol de Léon (FR).</p> <p>(74) Mandataire: KOCH, Gustave; Cabinet Plasseraud, 84, rue d'Amsterdam, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: MEDICINE FOR TREATING APOPTOSIS DYSFUNCTION CONTAINING OLIGOSACCHARIDES</p> <p>(54) Titre: MEDICAMENT POUR LE TRAITEMENT DES DEREGLEMENTS DE L'APOPTOSE CONTENANT DES OLIGOSACCHARIDES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a medicine comprising, as active principle, an efficient quantity of at least an oligosaccharide substance capable of modulating apoptosis dysfunction and optionally comprising, on at least some of its unit motifs, at least a substituent of the group comprising sulphate, methyl and acetyl groups, the substance being selected from the group comprising: oligosaccharides derived by enzymatic or chemical process from polymer groups including <math>\beta</math> 1-3 glucans optionally comprising <math>\beta</math> 1-6 branches; and oligosaccharides derived by enzymatic or chemical process from sulphated galactans, in particular carrageenans, agars and porphyranes.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention a pour objet un médicament comportant, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins une substance oligosaccharidique propre à moduler les dérèglements de l'apoptose et comportant éventuellement, sur au moins certains de ses motifs unitaires, au moins un substituant du groupe comprenant les groupements sulfate, méthyle et acétyle, la substance étant choisie dans le groupe comprenant les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des polymères du groupe comprenant les <math>\beta</math> 1-3 glucans comportant éventuellement des ramifications <math>\beta</math> 1-6, et les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des galactanes sulfatés, notamment les carraghénanes, les agars et les porphyranes.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TC	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**MEDICAMENT POUR LE TRAITEMENT DES DEREGLEMENTS DE L'APOPTOSE CONTENANT DES OLIGOSACCHARIDES**

L'invention a pour objet un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose.

On désigne par le terme "apoptose" la mort cellulaire programmée ou suicide cellulaire.

Cette mort correspond à une auto-élimination des cellules suivant un programme défini.

Elle se traduit tout d'abord par des renflements au niveau de la membrane plasmatique, renflements qui sont accompagnés d'un changement structural de la membrane, puis par une perte de volume de la cellule qui semble se contracter et s'effondrer sur elle-même.

Le noyau se condense et l'ADN est clivé en petits morceaux (Raff, "Nature", 356, 397, 1992; Bortner et al., "Trends in Cell. Biol." 5, 21, 1995).

In vivo, la cellule en apoptose est reconnue par les macrophages qui vont la phagocyter et l'éliminer en l'absence de tout processus inflammatoire.

In vivo toujours, l'apoptose est largement utilisée par les organismes vivants pour contrôler les populations cellulaires, en particulier les lymphocytes suite à leur activation.

Par ailleurs, l'apoptose joue, au cours du développement des organismes, un rôle primordial dans l'élimination des tissus embryonnaires non nécessaires (queue du lézard, ébauche des organes génitaux d'un sexe ou de l'autre), et dans la sculpture de l'organisme (élimination des palmures interdigitales entre les futurs doigts et autres).

Certains composés présents dans les organismes vivants induisent spécifiquement un phénomène apoptotique. Ainsi, par exemple chez les mammifères, la liaison du ligand Fas au récepteur membranaire Fas, également désigné par

APO-1 ou CD95, induit spécifiquement une apoptose; cette apoptose est utilisée par l'organisme vivant pour contrôler les populations de lymphocytes, notamment de lymphocytes T.

5 Les susdits récepteur et ligand représentent un système physiologique extrêmement intéressant qui est impliqué dans l'élimination spécifique de cellules qui ne sont plus désirées dans l'organisme.

10 On peut citer en particulier l'élimination cellulaire au cours de la maturation et de l'activation des lymphocytes T. En fait, le système Fas, c'est-à-dire Fas ligand/Fas récepteur, joue un rôle primordial dans l'homéostasie du système immunitaire.

15 Le récepteur Fas est un membre d'une famille de protéines qui agissent comme récepteurs à la surface des cellules et qui comprennent également les récepteurs TNF (facteur de nécrose tumorale) et NGF (facteur de croissance des nerfs).

20 Le récepteur Fas est exprimé dans de nombreuses cellules; il s'accumulerait au niveau de l'appareil de Golgi.

25 Le mécanisme par lequel le système Fas induit la mort cellulaire est inconnu mais fait appel à l'activation des protéases connues sous l'appellation ICE-like ("interleukine-1 bêta-converting enzyme" en anglais) ou caspases.

30 On peut noter que le ligand Fas peut être sécrété par les cellules pour induire leur propre suicide; mais étant donné que ce ligand se retrouve aussi à la surface de cellules activatrices, celles-ci vont de ce fait induire le suicide de cellules cibles par simple contact. Une fois activé, le récepteur Fas interagit avec de nombreuses protéines intracellulaires pour transmettre le signal déclenchant l'apoptose.

35 In vitro, il existe d'autres moyens pour induire une apoptose, par exemple en inhibant l'activité de certaines

kinases, et en particulier la kinase C; dans ce cas, on peut avoir recours à la staurosporine.

Ce produit est très efficace pour induire la mort des cellules par apoptose.

5 Il est néanmoins à remarquer que la transduction des signaux induits par la staurosporine est différente de celle faisant intervenir le récepteur Fas.

10 Toutefois, si les moyens d'activer l'apoptose sont différents, l'exécution du programme de mort induit par ces deux modes d'activation est équivalente et caractérisée par une activation de la cascade des caspases et un dérèglement de la mitochondrie qui relâche des composés (par exemple le cytochrome C) qui vont promouvoir la destruction programmée de la cellule. Ce phénomène est énergie-dépendant mais ne  
15 requiert pas la synthèse de nouvelles protéines. En fait, tout est prêt dans une cellule pour assurer sa propre destruction.

In vivo, la régulation du phénomène apoptotique a une importance considérable.

20 En effet, de nombreuses pathologies sont associées à son dérèglement.

On peut citer, par exemple, deux cas de dérèglement de l'apoptose dans lesquels celle-ci est modulée via le système Fas: il s'agit des maladies auto-immunes dans  
25 lesquelles l'apoptose est déficiente et de la destruction des lymphocytes T CD4+ infectés par HIV-1 dans lesquels l'apoptose est trop active.

Dans d'autres cas tels que les dégénérescences neuronales rencontrées par exemple dans la sclérose en  
30 plaques, l'apoptose est activée par des voies non encore connues.

Il existe d'autres pathologies dans lesquelles l'apoptose est déficiente; à cet égard, on peut citer l'accumulation de cellules cancéreuses dont l'apoptose  
35 semblerait dépendre du système FAS ("Green", Science,

vol.278, 1246, 1997).

La Société Demanderesse, au vu des constatations  
rappelées ci-dessus, a eu le mérite de trouver que, dès lors  
que l'on dispose d'un médicament capable de moduler les  
dérèglements de l'apoptose tant du point de vue d'une  
activation dans le cas des pathologies du groupe de celles  
comprenant les maladies auto-immunes et les pathologies du  
type cancer que du point de vue de son inhibition dans le  
cas des pathologies du groupe de celles comprenant le SIDA,  
il devenait possible de lutter contre ces maladies.

Et elle a eu le mérite non moins grand de trouver  
que certaines substances oligosacchari-diques et  
monosaccharidiques comportant éventuellement, sur au moins  
certains de leurs motifs unitaires, au moins un substituant  
du groupe comprenant les groupements sulfate, méthyle et  
acétyle, étaient propres à moduler les dérèglements de  
l'apoptose.

L'invention a donc pour objet un médicament  
caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe  
actif, une quantité efficace d'au moins une substance  
oligosaccharidique propre à moduler les dérèglements de  
l'apoptose, et comportant éventuellement, sur au moins  
certains de ses motifs unitaires, au moins un substituant du  
groupe comprenant les groupements sulfate, méthyle et  
acétyle, ladite substance étant choisie dans le groupe  
comprenant

- les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou  
chimique des polymères du groupe comprenant les  $\beta$  1-3  
glucans comportant éventuellement des ramifications  $\beta$  1-6,

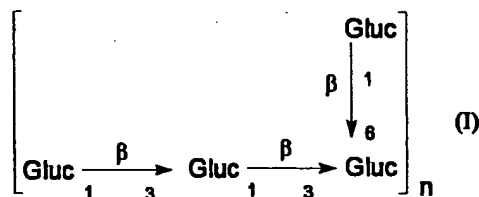
- les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou  
chimique des galactanes sulfatés, notamment les carraghé-  
nanes, les agars et les porphyranes.

Selon un mode de réalisation avantageux, le  
médicament conforme à l'invention comporte, à titre de  
principe actif, une quantité efficace d'au moins un

5

oligosaccharide propre à moduler les dérèglements de l'apoptose et répondant à la formule

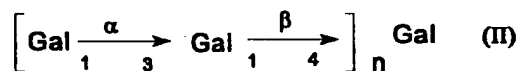
5



10 dans laquelle n représente un nombre entier de 1 à 50, de préférence de 5 à 10 et dans laquelle le nombre de branchements varie de 0 à 3 par unité de répétition.

15 Selon un autre mode de réalisation avantageux, le médicament conforme à l'invention comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins un disaccharide de répétition propre à moduler les dérèglements de l'apoptose et répondant la formule

20



25

dans laquelle n représente un nombre entier de 1 à 50, de préférence de 1 à 20, au moins certains des disaccharides de répétition de formule (II) pouvant comporter un ou plusieurs groupes sulfate.

30

Selon un autre mode de réalisation avantageux, le médicament conforme à l'invention comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace du produit propre à inhiber au moins partiellement l'apoptose et obtenu par hydrolyse à partir de iota-carraghénate de sodium, ce produit étant constitué par un mélange d'oligo-iota-carraghénanes désigné par I<sub>9</sub>, dont la teneur en oses totaux (déterminée selon Tillmans et Philippi) est de 62% et dont le profil de distribution par taille, estimé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon Zabłakis et

35

Perez, est:

	Iota-néocarratétraose (DP 2)	8-12%
	Iota-néocarrahexaose (DP 3)	23-27%
	Iota-néocarraoctaose (DP 4)	18-22%
5	Iota-néocarradécaose (DP 5)	13-17%
	Iota-néocarradodécaose (DP 6)	8-12%
	Oligo-iotacarraghénane (DP 7)	3- 7%
	Oligo-iotacarraghénanes constitués par 8	
	à 15 disaccharides de répétition (DP 8-15)	13-17%.

10 Les susdites méthodes sont décrites, pour ce qui est de Zablakakis E. & Perez J., dans "*Botanica marina*", 33, 273-276 (1990) et, pour ce qui est de Tillmans J. & Philippi K., dans "*Biochem. Z.*", 215, 30-60 (1930).

15 Pour préparer le produit I<sub>9</sub>, on peut procéder comme suit.

On incube le iotacarraghénane en présence de l'enzyme iotacarraghénase partiellement purifiée à une température de 45 - 50°C, puis on ultrafiltre les produits d'hydrolyse sur une membrane de 10 000 Da. On obtient ainsi

20 le produit I<sub>9</sub>.

Plus particulièrement, le polymère de iotacarraghénane est hydrolysé par une iotacarraghénase recombinante surexprimée dans la souche *Escherichia coli*.

25 La préparation de l'enzyme se fait par dissolution du culot bactérien (correspondant à 1 litre de culture) dans 50 ml de tampon Tris 10 mM pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, de façon à avoir au final, 500 U/ml.

30 Du point de vue pratique, on dissout 100 g de substrat iotacarraghénane dans 20 l d'eau distillée à chaud (80°C) de façon à obtenir à une concentration à 5 g/l puis on ajuste le pH à 7,5 avec du carbonate d'ammonium.

35 Pour effectuer l'hydrolyse, l'enzyme est ajoutée à 50 U/g de polymère. L'ultrafiltration en continu est engagée après 30 minutes; il s'agit d'une ultrafiltration tangentielle.



Pour cette ultrafiltration tangentielle, on peut utiliser un appareil de marque Pellicon comportant une cassette de 10 000 Da 0.46 m<sup>2</sup> PTGC de la Société Millipore; cet appareil est réglé sur 2 bars en entrée et 0.5 bar en sortie.

La sortie du filtrat est partiellement fermée pour maintenir le débit de filtration à 1 litre par heure.

Les caractéristiques de l'enceinte réactionnelle sont choisies de façon à permettre un approvisionnement de l'enzyme en substrat jusqu'à épuisement des 20 l de solution et le maintien d'un volume fixe de 2 litres.

On obtient 18 l d'un ultrafiltrat qui est concentré jusqu'à 1 litre par évaporation rotative, puis le concentrat est lyophilisé. Le lyophilisat ainsi obtenu contient le produit I<sub>9</sub>.

Les oligocarraghénanes de la fraction I<sub>9</sub> ainsi obtenues ont été soumis à un fractionnement supplémentaire par chromatographie basse pression sur colonne de Biogel P6 puis sur colonne de Sephadex G10.

On obtient ainsi les fractions identifiées plus haut.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, le médicament conforme à l'invention comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace du produit propre à inhiber au moins partiellement l'apoptose et constitué par la fraction DP 7 du produit I<sub>9</sub>.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, le médicament conforme à l'invention comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace du produit propre à activer les dérèglements de l'apoptose, obtenu par extraction aqueuse acide à partir d'une algue brune dénommée *Laminaria digitata*, ce produit étant constitué par un mélange d'oligo  $\beta$  1-3 glucans désignés par L<sub>11</sub> et comportant de 1 à 50, de préférence de 20 à 30 unités saccharidiques, le produit en question présentant le spectre RMN montré à la figure 1.

Il est à noter que le produit L<sub>11</sub> peut également être obtenu par extraction aqueuse à partir des algues brunes en général dont *Laminaria digitata* est un représentant.

5           La préparation du produit L<sub>11</sub> peut être effectuée comme suit.

A 300 g d'algues fraîches de type *Laminaria digitata* récoltées au mois d'août sous forme fraîche ou sèche, on ajoute progressivement 1 l d'acide sulfurique 0,3%.

10           L'opération est réalisée au bain-marie à une température d'environ 70°C pendant 2 heures et 30 minutes sous agitation.

Cette opération est renouvelée deux fois.

15           L'extrait obtenu est clarifié par filtration sur un filtre de porosité 1,2 µm.

Le liquide résultant de cette filtration est soumis à une ultrafiltration tangentielle sur une membrane de porosité 50000 Daltons.

20           L'ultrafiltration est réalisée en maintenant une pression de 1 bar.

On obtient ainsi un ultrafiltrat dont le pH est ramené à 5,5 présentant un volume d'environ 0,8 litre. Cet ultrafiltrat est soumis à une dialyse sur une membrane en ester de cellulose de porosité égale à 500 Daltons.

25           On obtient un dialysat qui est concentré à un volume de 100 ml par évaporation à 80°C à l'aide d'un dispositif de type ROTOVAPOR, puis lyophilisé.

On obtient 7 g d'une poudre couleur crème constituant le produit L<sub>11</sub>.

30           Une analyse par chromatographie ionique couplée à l'ampérométrie et utilisant une résine échangeuse d'ions commercialisée par la Société DIONEX, montre que les oligo-β 1-3 glucanes constitutifs de la susdite poudre ont en fait 1 à 50, de préférence de 20 à 30 unités saccharidiques.

Les conditions chromatographiques (méthode dite HPLC, c'est-à-dire "Chromatographie liquide sous haute pression") étant les suivantes:

	Colonne	Carbopac PA1
5	Débit	1 ml/min
	Détection	ampérométrique - électrode en or
	Injection	50 µl
	Gradient d'élution	soude 50 mM / acétate de sodium 500 mM - eau déminéralisée
10	Temps d'analyse	15 minutes
	Temps de rétention	≈ 9 - 10 minutes

on a obtenu la courbe qui est montrée à la figure 16 et qui identifie le produit L<sub>11</sub>.

L'examen du spectre RMN du <sup>13</sup>C du produit L<sub>11</sub>, réalisé à partir d'une solution à 80 mg/ml dans D<sub>2</sub>O et représenté à la figure 1, montre un squelette de β-D-(1-3)-glucane dont les résonances des différents carbones ont pu être identifiées (elles sont réunies dans le tableau A ci-après) par comparaison avec les valeurs de la littérature [voir Williams et al., 1992 "Development of a water-soluble, sulfated (1-3)-β-D-glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*", Carbohydr. Res. 235: 247:25].

25

#### TABLEAU I

Déplacements chimiques (ppm) du spectre RMN du <sup>13</sup>C  
de l'échantillon L<sub>11</sub>

Squelette de β-D-(1-3)-glucane	C1	102,76
	C2	73,41
	C3	84,94
	C4	68,45
	C5	75,89
	C6	61,06
Résidu D-mannitol	C6	63,42

30

Les médicaments conformes à l'invention définis plus

haut comportent les adjuvants de formulation classiques correspondant à leur mode d'administration et à la posologie retenues.

5 L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, caractérisé par le fait que l'on fait comporter à une composition galénique au moins l'un des principes actifs identifiés ci-dessus.

10 Selon un mode de réalisation avantageux, la susdite composition galénique est propre à une administration par voie intraveineuse.

15 L'invention vise également l'utilisation, en vue de la préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, des substances saccharidiques du groupe comprenant les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des polymères du groupe comprenant les  $\beta$  1-3 glucans comportant éventuellement des ramifications  $\beta$  1-6, et les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des galactanes sulfatés, 20 notamment les carraghénanes, les agars et les porphyranes.

Plus particulièrement, elle vise l'utilisation, en vue de la préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, des oligosaccharides de formule (I) et de ceux de formule (II).

25 Plus particulièrement encore, elle vise l'utilisation des produits désignés par  $I_9$  et  $L_{11}$  et des fractions DP 2 et DP 7 de  $I_9$  en vue de la préparation de médicaments pour le traitement des dérèglements de l'apoptose.

30 L'invention sera encore mieux comprise à l'aide du complément de description qui suit et des exemples qui ne sont nullement limitatifs mais correspondent à des modes de réalisation avantageux.

35 Dans les expériences qui vont être décrites ci-après, on a travaillé sur des cultures cellulaires dans lesquelles on a déclenché un processus apoptotique en ayant

recours au système Fas ou à la staurosporine, puis on a étudié les effets de modulation pouvant être obtenus avec les produits constituant le principe actif des médicaments conformes à l'invention.

5 Dans le cadre de ces expériences, on a déterminé, d'une part, les quantités appropriées de principe actif pour obtenir l'effet recherché de modulation de l'apoptose et, d'autre part, le ou les moments auxquels il convient d'administrer, pour obtenir l'effet de modulation recherché,  
10 le principe actif ou le médicament le comportant.

#### EXEMPLE 1

On a travaillé sur une culture de fibroblastes murins génétiquement modifiés pour exprimer constitutivement  
15 le récepteur humain Fas; le principe actif testé était le produit désigné par I<sub>9</sub>.

Dans une expérience préalable, on a montré que les fibroblastes murins sont détruits par apoptose lorsqu'ils sont mis en présence soit du ligand Fas soit d'un anticorps agoniste reconnaissant le récepteur Fas et désigné dans ce  
20 qui suit par FasAb.

Dans une autre expérience préalable, on a déterminé que le produit I<sub>9</sub> n'altérerait pas la croissance cellulaire, qu'il n'était pas toxique vis-à-vis des fibroblastes murins  
25 aux concentrations utilisées et qu'il pouvait donc être ajouté à un milieu de culture cellulaire sans créer de problèmes.

Le milieu utilisé pour la culture des fibroblastes murins est celui commercialisé par la Société Life Technologies sous l'appellation "Dulbecco's Modified Eagle Medium"; ce milieu est décrit dans "Virology" 8, 396 (1959)  
30 par Dulbecco et al.

On a ajouté à ce milieu 5% en volume de sérum de veau foetal.

35 Ce milieu était ensuite inoculé avec des

## 12

fibroblastes murins en présence d'une quantité suffisante d'antibiotiques pour éliminer les possibilités de contamination; la concentration du milieu de culture en fibroblastes a été de  $10^5$  cellules par ml de milieu.

5           La culture a été effectuée à l'intérieur d'un incubateur dans lequel la température a été maintenue à 37°C; l'atmosphère remplissant l'incubateur contenait 5% de CO<sub>2</sub>.

10           Après une incubation de 24 heures, on a ajouté soit le Fas ligand, soit le FasAb directement dans le milieu.

La quantité de FasAb ajoutée a été de 50 µg par ml de milieu de culture.

15           Dans ces conditions, environ 70% des cellules de la culture sont détruites par apoptose après environ 24 heures d'incubation.

Cette destruction est mise en évidence par coloration au cristal violet des cellules survivantes.

On a procédé ensuite à un certain nombre d'essais destinés à mettre en évidence l'action du principe actif.

20           Dans ces essais, on a fait varier, d'une part, la concentration à laquelle le principe actif est mis en oeuvre dans le milieu de culture et, d'autre part, le moment auquel le principe actif est ajouté à ce milieu de façon à déterminer les concentrations optimales en principe actif  
25           ainsi que le ou les moments les plus opportuns d'introduction du principe actif par rapport à l'addition de FasAb.

On a fait varier les concentrations en principe actif de 0,001 à 2 mg par ml.

30           On a successivement étudié l'effet obtenu en ajoutant d'abord le principe actif avant, puis en même temps et enfin après FasAb.

Dans un premier essai, on a ajouté le principe actif 24 heures avant FasAb.

35           Dans le cadre de cet essai, on a noté l'effet obtenu

en utilisant successivement 0, puis 5, puis 10, puis 50, puis 100 et enfin 500 ng de FasAb par ml de culture et, dans chaque cas, des concentrations en principe actif successivement égales à 0,25, puis 0,5 et enfin 1 mg par ml de milieu de culture, étant entendu que l'on a également noté l'effet obtenu en l'absence de principe actif, c'est-à-dire pour une concentration de 0%.

Après 24 heures d'incubation, on procède à l'analyse de survie.

Le résultat de cette analyse est matérialisé par l'histogramme de la figure 2.

Sur l'axe des abscisses de cet histogramme, figure la concentration du milieu en FasAb exprimée en ng/ml et, sur l'axe des ordonnées, le taux de survie exprimé en %.

Pour chacune des concentrations en FasAb, on a matérialisé le taux de survie pour chacune des quatre concentrations en principe actif, soit 0 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml et 1 mg/ml, par quatre rectangles parallèles à l'axe des ordonnées, l'écart-type étant matérialisé chaque fois par un segment surmontant le rectangle correspondant parallèlement à l'axe des ordonnées.

Le rectangle correspondant à 0 mg/ml de principe actif est chaque fois celui situé le plus à gauche, celui correspondant à 0,25 mg/ml de principe actif est situé sur sa droite, celui correspondant à 0,5 mg/ml est situé à la droite du précédent et ainsi de suite.

Les quatre rectangles sont chaque fois identifiés par des hachures, pointillés ou dégradés particuliers.

L'examen des résultats ainsi réunis sur l'histogramme de la figure 2 montre qu'en l'absence de principe actif, le taux de survie diminue avec l'augmentation de la concentration en FasAb et que ce taux de survie est sensiblement amélioré par l'addition du principe actif.

Dans un deuxième essai, on a ajouté au milieu de

culture en même temps le FasAb et le principe actif.

Dans ce deuxième essai, on a noté l'effet obtenu en utilisant successivement les mêmes concentrations en FasAb et en principe actif que dans le premier essai.

5           Après 24 heures d'incubation, on procède à l'analyse de survie.

10           Les résultats enregistrés sont réunis sur l'histogramme de la figure 3 qui est constitué suivant les mêmes principes que ceux exposés à propos de celui de la figure 2.

L'examen de ces résultats montre que le taux de survie évolue d'une manière analogue à celle notée pour le premier essai.

15           Dans une troisième série d'essais, on a ajouté le principe actif après FasAb, à savoir successivement:

          tout d'abord, 1 heure après le FasAb,

          ensuite, 3 heures après le FasAb et,

          enfin, 6 heures après le FasAb,

20           en faisant toujours varier la concentration en FasAb de 0 à 500 ng par ml de culture.

Dans le cas de l'addition de principe actif effectuée 1 heure après le FasAb,

25           - on a réuni sur l'histogramme de la figure 4 les résultats notés pour des concentrations en  $I_9$  de 0 mg/ml, de 0,005 mg/ml, de 0,01 mg/ml et enfin de 0,05 mg/ml,

          - on a réuni sur l'histogramme de la figure 5 les résultats notés pour des concentrations en  $I_9$  de 0 mg/ml, de 0,1 mg/ml, de 0,25 mg/ml et enfin de 0,5 mg/ml, et

30           - on a réuni sur l'histogramme de la figure 6 les résultats notés pour des concentrations en  $I_9$  de 0 mg/ml, de 0,25 mg/ml, de 0,5 mg/ml et enfin de 1 mg/ml.

35           Les histogrammes des figures 4 à 6 sont constitués suivant les mêmes principes que ceux exposés à propos de celui de la figure 2.



Dans le cas de l'addition de principe actif effectuée 3 heures après l'addition de FasAb, on a réuni sur l'histogramme de la figure 7 les résultats notés pour des concentrations en  $I_9$  de 0 mg/ml, de 0,25 mg/ml, de 0,5 mg/ml et de 1 mg/ml.

Dans le cas de l'addition de principe actif effectuée 6 heures après l'addition de FasAb, on a réuni sur l'histogramme de la figure 8 les résultats notés pour des concentrations en  $I_9$  de 0 mg/ml, de 0,25 mg/ml, de 0,5 mg/ml et de 1 mg/ml.

Les histogrammes des figures 7 et 8 sont constitués suivant les mêmes principes que ceux exposés à propos de celui de la figure 2.

L'examen de l'ensemble des résultats réunis sur les histogrammes des figures 4 à 8 montre que, dans le cas de l'addition du principe actif après l'addition de FasAb, le taux de survie augmente toujours; cet effet a toutefois tendance à diminuer lorsqu'augmente le temps écoulé entre les additions successives de FasAb et de principe actif; il est par ailleurs sensible à la concentration en principe actif lorsque celle-ci est inférieure à 0,25 mg/ml; on n'obtient pas d'amélioration sensible pour les concentrations supérieures à 0,25 mg/ml.

Dans l'expérience qui vient d'être décrite, l'apoptose était induite par le système FasAb.

On a effectué une autre expérience en induisant l'apoptose par l'inhibiteur de kinase constitué par la staurosporine.

Il est rappelé que la staurosporine induit une mort apoptotique dans le cas de la plupart des cellules à des doses variant de 0,5 à 5  $\mu$ M.

Dans cette expérience, l'addition de staurosporine et de  $I_9$  était simultanée.

On a utilisé deux doses de  $I_9$ , à savoir 0,2 mg/ml et 0,5 mg/ml.

La staurosporine a été mise en oeuvre à raison de 0,5  $\mu\text{M}$  puis de 1  $\mu\text{M}$  et enfin de 1,5  $\mu\text{M}$ .

Le taux de survie des cellules traitées a été déterminé dans chaque cas après 18 heures d'incubation.

5 Les résultats enregistrés apparaissent sur l'histogramme représenté à la figure 9 et qui montre le taux de survie exprimé en % en fonction de la concentration en staurosporine et pour les doses de  $\text{I}_9$  identifiées plus haut.

10 Une expérience témoin a été effectuée pour une concentration en staurosporine de 0  $\mu\text{M}$ .

L'examen des résultats apparaissant sur l'histogramme montre que la mise en oeuvre de  $\text{I}_9$  atténue l'apoptose induite par la staurosporine.

15 Il résulte des deux expériences qui viennent d'être décrites que le médicament conforme à l'invention permet d'obtenir une atténuation significative de l'apoptose lorsque celle-ci est induite par différents agents.

## **EXEMPLE 2**

20 Dans cet exemple, la culture cellulaire étudiée était une culture de cellules humaines immortalisées, constituées de lymphocytes T (type Jurkat).

25 Le milieu de culture utilisé est celui commercialisé par la Société Life Technologies sous l'appellation "RPMI 1640 Medium"; ce milieu est décrit par Moore et al. dans la publication "A.M.A." 199, 519 (1967).

On ajoute à ce milieu 10% en volume de sérum de veau foetal et des antibiotiques pour éliminer les possibilités de contamination.

30 On inocule ce milieu avec une quantité de  $10^6$  lymphocytes T par ml de milieu.

La température de l'incubation est de 37°C et l'atmosphère remplissant l'incubateur contient 5% de  $\text{CO}_2$ .

35 Après une incubation de 24 heures, on ajoute simultanément le FasAb et le principe actif.

La quantité de FasAb (il s'agit de celui fabriqué par la Société Upstate Biotechnology et commercialisé sous le n° de catalogue 05-201 par la Société Euromedex) ajoutée est de 50 ng/ml de culture.

5 Le principe actif est constitué successivement par le produit I<sub>9</sub> et le produit L<sub>11</sub>.

Les quantités mises en oeuvre sont dans chaque cas de 0,5 mg/ml.

10 L'analyse de survie est effectuée 18 heures après le début de l'expérience.

Cette analyse de survie consiste à faire passer un volume de culture contenant 10<sup>4</sup> cellules dans un appareil du type de ceux qui fonctionnent par cytométrie de flux, en l'occurrence celui commercialisé par la Société Beckton Dickinson sous l'appellation "FAC Scan cytometer".

15 Cet appareil utilise une sonde qui détecte la présence de phosphatidyl sérine à la surface des cellules; la présence de ce produit montre que les cellules en question sont apoptotiques.

20 Les résultats de cette analyse apparaissent sur les figures 10 à 13 sur chacune desquelles sont représentés trois polygones, respectivement A, B et C dont les contours sont définis pour être représentatifs de populations cellulaires distinctes; le polygone A entoure un ensemble de  
25 cellules vivantes, le polygone B un ensemble de cellules apoptotiques et le polygone C un ensemble de cellules mortes.

30 Dans le tableau II ci-après, on a réuni les pourcentages de cellules vivantes, de cellules apoptotiques et le pourcentage de cellules mortes dans le cas de chacune des figures 10 à 13 qui vont être commentées ci-après.

**TABLEAU II**

	Cellules vivantes Polygone A	Cellules apoptotiques Polygone B	Cellules mortes Polygone C
Contrôle (Fig. 10)	97 %	1 %	1 %
FasAb (Fig. 11)	77 %	21 %	1 %
FasAb / I <sub>g</sub> (Fig. 12)	90 %	2 %	6 %
FasAb / L <sub>11</sub> (Fig. 13)	74 %	13 %	9 %

La figure 10 illustre l'analyse de survie effectuée sur un échantillon d'un milieu de culture dans lequel on n'a ajouté ni FasAb, ni principe actif; il s'agit d'un témoin; dans ce cas, on voit qu'il n'y a substantiellement que des cellules vivantes qui se trouvent dans le polygone A (voir ligne 1 du tableau II).

La figure 11 illustre l'analyse de survie effectuée sur un échantillon d'un milieu de culture dans lequel on n'a ajouté que du FasAb; dans ce cas, on voit que le polygone B contient 21% de cellules apoptotiques (voir ligne 2 du tableau II).

La figure 12 illustre l'analyse de survie effectuée sur un échantillon d'un milieu de culture ayant été additionné simultanément de FasAb et de principe actif I<sub>g</sub> (0,5 mg/ml) ; dans ce cas, on voit que le polygone B ne contient pratiquement pas de cellules apoptotiques (2%), le polygone A contenant beaucoup de cellules vivantes et le polygone C une certaine concentration (6%) de cellules mortes (voir ligne 3 du tableau II).

La figure 13 illustre l'analyse de survie effectuée sur un échantillon d'un milieu de culture ayant été additionné simultanément de FasAb et de principe actif L<sub>11</sub> (0,5 mg/ml); dans ce cas, on voit que le polygone B contient une quantité importante (13%) de cellules apoptotiques et le polygone C une quantité non négligeable (9%) de cellules mortes (voir ligne 4 du tableau II).

Les conclusions susceptibles d'être tirées de l'examen des figures 10 à 13 et de l'analyse du pourcentage des cellules présentes dans les différents polygones font, par conséquent, que le principe actif I<sub>9</sub>, dans le cadre de cette expérience, inhibe l'apoptose FasAb (on passe de 21% à 2% de cellules apoptotiques). Toutefois, une légère augmentation du nombre de cellules mortes est notée (ce nombre passe de 1% à 6%). Si on considère le nombre de cellules vivantes, une protection de 13% est observée (on passe de 77% à 90%).

Concernant le principe actif L<sub>11</sub>, on observe une augmentation du nombre de cellules mortes (on passe de 1% à 9%) par rapport à l'effet induit par FasAb uniquement. Le principe L<sub>11</sub>, bien que n'induisant pas un effet important sur le nombre de cellules vivantes, agirait donc comme un potentialisateur de la mort cellulaire.

Dans le but d'optimiser l'action de L<sub>11</sub>, on a réalisé les expériences suivantes.

On administre, en utilisant la même culture que précédemment:

- dans une première expérience, 50 ng/ml de FasAb seul (de la provenance Euromedex identifiée plus haut)
- dans une deuxième expérience, la même quantité du même FasAb simultanément à 0,5 mg/ml de produit L<sub>11</sub> et
- dans une troisième expérience, 0,5 mg/ml du produit L<sub>11</sub> puis, 24 heures plus tard, 50 ng/ml du même FasAb.

Les résultats obtenus après 18 heures d'incubation sont comme suit en comparaison avec ce qui est observé sur une culture témoin n'ayant été additionnée ni de FasAb ni de L<sub>11</sub>, la grandeur prise en considération étant le nombre de cellules vivantes:

- dans le cas d'addition de FasAb seul : le nombre de cellules vivantes diminue de 3,6%,
- dans le cas de l'addition simultanée de FasAb et de L<sub>11</sub>, le nombre de cellules vivantes diminue de 6,4% et

- dans le cas de l'addition différée de FasAb et de L<sub>11</sub>, le nombre de cellules vivantes diminue de 13,7%.

Il s'ensuit que L<sub>11</sub> est beaucoup plus actif lorsqu'il est administré avant FasAb.

5 On indique que des résultats analogues ont été obtenus en remplaçant le FasAb identifié ci-dessus par un FasAb d'une autre origine, c'est-à-dire celui fabriqué par la Société Alexis Corporation (San Diego, USA) et commercialisé par la Société Coger SA (Paris).

10 De l'examen des résultats des expériences qui précèdent, il apparaît qu'un médicament à base du produit L<sub>11</sub> permet de potentialiser l'apoptose; on peut donc envisager son utilisation dans le traitement de maladies du type auto-immunes et du cancer.

15 D'autres expériences ont permis de vérifier les effets produits par l'administration du produit I<sub>9</sub>, d'une part, dans des cultures de lymphocytes dans lesquels a été induite une apoptose Fas de faible intensité et, d'autre part, dans le cas des cultures de lymphocytes dans lesquels a été induite une apoptose Fas de forte intensité.

20 L'apoptose Fas de faible intensité peut être induite en utilisant un FasAb de provenance Euromedex; une telle apoptose peut être de l'ordre de 3 à 10%.

25 L'apoptose Fas de forte intensité peut être induite en utilisant un FasAb de provenance Alexis Corporation; une telle apoptose peut être de l'ordre de 20 à 50%.

30 Les expériences réalisées en mettant en oeuvre une dose de 0,2 mg/ml du produit I<sub>9</sub> sont illustrées par la figure 14 qui montre les effets enregistrés, c'est-à-dire soit la stimulation soit l'inhibition de l'apoptose (exprimées en %) en fonction de l'intensité de l'apoptose (en %) induite par FasAb seul (concentrations de 50 à 200 ng/ml).

La figure 14 montre que

- 35
- dans le cas d'apoptoses de faible intensité, de l'ordre

de 3 à 10%, matérialisées sur l'axe des abscisses par les points a, b, c, d, e, f, g, h, i, l'administration de I<sub>9</sub> provoque une potentialisation de 20 à 40% de l'apoptose par rapport à l'apoptose induite par FasAb seul et

- dans le cas d'apoptoses de forte intensité, de l'ordre de 20 à 50%, matérialisées sur l'axe des abscisses par les points l, m, n, p, q, l'administration de la même quantité de I<sub>9</sub> provoque une inhibition de l'apoptose de 5 à 20% par rapport à l'apoptose produite par FasAb seul.

Sachant qu'il est possible de déterminer chez un sujet donné l'apoptose induite au niveau des lymphocytes, il devient donc possible de moduler celle-ci selon l'intensité constatée de ladite apoptose dans le sens de la potentialisation ou dans le sens de l'inhibition en administrant à ce sujet un médicament à base de I<sub>9</sub>.

Ce médicament pourra, par conséquent, permettre de corriger l'apoptose dans le sens de la potentialisation lorsque le sujet est atteint d'une affection du type cancer ou maladie auto-immune correspondant à une apoptose faible et dans le sens d'une inhibition lorsque le sujet est atteint d'une affection du type syndrome immuno-déficient correspondant à une apoptose forte.

Ceci étant, on précise que les lymphocytes T type Jurkat présentes dans les cultures soumises aux expériences qui précèdent, sont des cellules dont le gène suppresseur de tumeur p53 ou protéine p53 (Bing An et al., 1998, "Cell Death and Differentiation" 5, 1062-1075) est muté et, de ce fait, inactif.

Les effets observés avec les produits utilisés conformément à l'invention, notamment avec I<sub>9</sub> et L<sub>11</sub>, sont donc probablement p53 indépendants; autrement dit, les produits I<sub>9</sub> et L<sub>11</sub> sont capables de potentialiser la stimulation ou l'inhibition de l'apoptose de par leur seule

présence et indépendamment de la présence ou de l'absence du gène p53 actif.

Or, dans la plupart des cancers humains (voir Hollstein et al., 1994, "Nucl. Acid Res.", 22, 3551), la protéine p53 est mutée, donc inactive; il s'ensuit que la mise en oeuvre d'un médicament à base d'un des produits conformes à l'invention et en particulier des produits I<sub>9</sub> et L<sub>11</sub> permet de remédier aux dysfonctionnements de la protéine p53 et de traiter les affections du type cancer et les maladies auto-immunes.

L'invention permet, par conséquent, de traiter les affections en question par une voie fondamentalement différente et plus simple que la thérapie génique qui repose sur le principe visant notamment à réintroduire un gène p53 normal dans le génome des cellules mutées d'un sujet malade.

On sait que la plupart des cellules cancéreuses ont perdu leur sensibilité à l'apoptose FasAb et que la plupart des agents anticancéreux actuellement utilisés agissent en activant le gène p53 qui, lui, agit positivement sur le système FasAb. Or, ces systèmes ne fonctionnent plus si p53 est muté (Müller et al. 1998, J. Exp. Med. 188, 2033-2043).

Selon les observations récentes, le système FasAb est capital pour la destruction des cellules cancéreuses, soit par le système immunitaire, soit par l'action des drogues anticancéreuses; il s'ensuit que le fait que les produits utilisés conformément à l'invention et notamment I<sub>9</sub> et L<sub>11</sub> modulent l'apoptose desdites cellules cancéreuses de manière indépendante de p53, revêt une importance considérable et permet d'envisager la mise au point d'une nouvelle génération de médicaments notamment anticancéreux.

### EXEMPLE 3

Le produit I<sub>9</sub> est composé, comme montré plus haut, d'un mélange d'oligo-iota-carraghénanes.

On a testé l'effet induit par différents



constituants de ce mélange, en particulier des fractions DP 2, DP 3, DP 4, DP 5 et DP 7.

On a également testé le polymère constituant la matière première de I<sub>9</sub>, ainsi que le produit dénommé KIK (hexasaccharide de type kappa-iota-kappa).

Pour ces expériences, on a procédé comme indiqué à l'exemple 1 en introduisant simultanément, d'une part, 0,2 mg/ml de chacune des susdites fractions de I<sub>9</sub> et, d'autre part, 100 ng/ml de FasAb d'origine Euromedex.

Après 24 heures d'incubation, on a fait les constatations résumées ci-après.

Les fractions DP 2, DP 3, DP 4 et DP 5 sont inactives et ne stimulent pas l'apoptose induite par une faible dose (100 ng/ml) de FasAb de provenance Euromedex qui induit par elle-même 6% de mort cellulaire après 18 heures d'incubation.

Par contre, un effet stimulateur très fort est obtenu pour la fraction DP 7 (50%) et par le produit I<sub>9</sub> (70%), ce qui montre qu'un des composants actifs du mélange I<sub>9</sub> peut être constitué par la fraction DP 7; par ailleurs, le produit KIK n'a pas d'activité.

On a enfin trouvé que le polymère constituant la matière première pour la préparation de I<sub>9</sub> avant clivage par l'enzyme iotase est, lui aussi, actif et stimule une apoptose Fas de faible intensité. Par contre, l'enzyme iotase elle-même, mise en oeuvre à raison de 50 unités, n'a pas d'activité lorsqu'elle est incubée avec les cellules.

Il s'ensuit que le principe actif I<sub>9</sub>, qui n'a pas d'activité apoptotique intrinsèque, induit une très forte stimulation dans le cas d'une apoptose FasAb de faible intensité.

#### **EXEMPLE 4**

Il a été procédé à une expérience complémentaire confirmant les résultats traduits par la figure 14.

Dans le cas des phénomènes apoptotiques induits par Fas, la première des caspases de la cascade de caspases activées est la caspase 8.

5 Il a été procédé à la mesure de l'activité de cette capsase 8, qui est une enzyme protéolytique, après lyse des cellules Jurkat traitées ou non avec FasAb seul et avec FasAb en même temps qu'avec I<sub>9</sub>.

Pour ce faire, on a mesuré

- 10 • l'activité de la caspase 8 dans une première fraction d'une culture de cellules Jurkat en l'absence de FasAb et de I<sub>9</sub>; le pourcentage de cellules vivantes dans la culture est de 93%;
- 15 • l'activité de la caspase 8 dans une deuxième fraction de la même culture, 18 heures après incubation avec 500 ng/ml de FasAb de provenance Euromedex (qui, comme indiqué plus haut, induit une faible apoptose, de l'ordre de 13%); le pourcentage de cellules vivantes dans la culture est de 80%;
- 20 • l'activité de la caspase 8 dans une troisième fraction de la même culture, 18 heures après incubation avec 500 ng/ml de FasAb de provenance Euromedex et de 0,2 mg/ml de I<sub>9</sub>; le pourcentage de cellules vivantes dans la culture est de 50%;
- 25 • l'activité de la caspase 8 dans une quatrième fraction de la même culture, 18 heures après incubation avec 25 ng/ml de FasAb de provenance Alexis (qui, comme indiqué plus haut, induit une apoptose intense, de l'ordre de 40%); le pourcentage de cellules vivantes dans la culture est de 53%;
- 30 • l'activité de la caspase 8 dans une cinquième fraction de la même culture, 18 heures après incubation avec 25 ng/ml de FasAb de provenance Alexis et de 0,2 mg/ml de I<sub>9</sub>; le pourcentage de cellules vivantes dans la culture est de 59%;

35 La mesure de l'activité caspase a été effectuée

chaque fois à l'aide du kit commercialisé par la Société Ozyme sous la dénomination "Apo Alert Flice FLuor" No. K2028-2.

Les résultats de ces mesures sont réunis dans l'histogramme de la figure 15.

L'examen de cet histogramme montre que

- l'activité caspase 8 est faiblement stimulée (facteur voisin de 1,37) par FasAb Euromedex seul, l'administration simultanée de I<sub>9</sub> induisant une stimulation forte (facteur voisin de 3,93);
- l'activité caspase 8 est fortement stimulée (facteur voisin de 4,96) par FasAb Alexis seul, cette forte stimulation étant diminuée (facteur voisin de 4,05) lorsque I<sub>9</sub> est introduit simultanément à FasAb Alexis.

Il existe, par conséquent, une corrélation nette entre l'apoptose et l'activité caspase 8.

Le produit I<sub>9</sub> représente donc un produit capable de moduler l'activité de la caspase 8.

Le fait que l'on montre que cette enzyme est essentielle dans la voie biochimique de l'apoptose induite par Fas (Juo et al., Curr. Biol. 8, 1001-1008, 1998), permet d'envisager de nouveaux médicaments à base d'oligosaccharides permettant de cibler les enzymes du type caspase.

Ces produits représentent donc une alternative à une thérapie basée sur des peptides portant la séquence reconnue par la caspase 8 ("substrats suicide" de caspase 8).

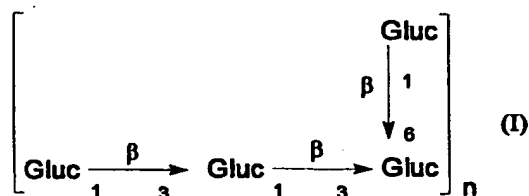
REVENDICATIONS

1. Médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins une substance oligosaccharidique propre à moduler les dérèglements de l'apoptose et comportant éventuellement, sur au moins certains de ses motifs unitaires, au moins un substituant du groupe comprenant les groupements sulfate, méthyle et acétyle, la substance étant choisie dans le groupe comprenant

- les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des polymères du groupe comprenant les  $\beta$  1-3 glucans comportant éventuellement des ramifications  $\beta$  1-6, et

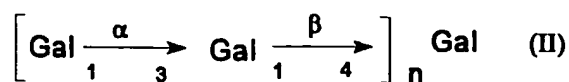
- les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des galactanes sulfatés, notamment les carraghénanes, les agars et les porphyranes.

2. Médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins un oligosaccharide propre à moduler les dérèglements de l'apoptose et répondant à la formule



dans laquelle n représente un nombre entier de 1 à 50, de préférence de 5 à 10 et dans laquelle le nombre de branchements varie de 0 à 3 par unité de répétition.

3. Médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins un disaccharide de répétition propre à moduler les dérèglements de l'apoptose et répondant à la formule



5 dans laquelle n représente un nombre entier de 1 à 50, de  
préférence de 1 à 20, au moins certains des disaccharides de  
répétition de formule (II) pouvant comporter un ou plusieurs  
groupes sulfate.

10 4. Médicament caractérisé par le fait qu'il  
comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace  
du produit propre à inhiber au moins partiellement  
l'apoptose et obtenu par hydrolyse à partir de iota-  
carraghénate de sodium, ce produit étant constitué par un  
15 mélange d'oligo-iota-carraghénanes désigné par I<sub>9</sub>, dont la  
teneur en oses totaux (déterminée selon Tillmans et  
Philippi) est de 62% et dont le profil de distribution par  
taille, estimé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide  
selon Zablakakis et Perez, est:

	Iota-néocarratétraose (DP 2)	8-12%
20	Iota-néocarrahexaose (DP 3)	23-27%
	Iota-néocarraoctaose (DP 4)	18-22%
	Iota-néocarradécaose (DP 5)	13-17%
	Iota-néocarradodécaose (DP 6)	8-12%
	Oligo-iotacarraghénane (DP 7)	3- 7%
25	Oligo-iotacarraghénanes constitués par 8 à 15 disaccharides de répétition (DP 8-15)	13-17%.

30 5. Médicament caractérisé par le fait qu'il  
comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace  
du produit propre à activer les dérèglements de l'apoptose,  
obtenu par extraction aqueuse acide à partir des algues  
brunes et plus particulièrement d'une algue brune dénommée  
*Laminaria digitata*, ce produit étant constitué par un  
mélange d'oligo β 1-3 glucans désignés par L<sub>11</sub> et comportant  
de 1 à 50, de préférence de 20 à 30 unités saccharidiques,  
35 le produit en question présentant le spectre RMN montré à la

figure 1.

6. Médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace du produit propre à activer les dérèglements de l'apoptose et constitué par la fraction DP 7 du produit I<sub>9</sub>.

7. Procédé de préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, caractérisé par le fait que l'on fait comporter à une composition galénique au moins l'un des principes actifs des médicaments selon au moins l'une des revendications 1 à 6.

8. Utilisation, en vue de la préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, d'au moins l'une des substances oligosaccharidiques comportant éventuellement, sur au moins certains de leurs motifs unitaires, au moins un substituant du groupe comprenant les groupements sulfate, méthyle et acétyle, lesdites substances qui sont propres à moduler les dérèglements de l'apoptose étant choisies dans le groupe comprenant

- les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des polymères du groupe comprenant les  $\beta$  1-3 glucans comportant éventuellement des ramifications  $\beta$  1-6, et

- les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des galactanes sulfatés, notamment les carraghénanes, les agars et les porphyranes.

9. Utilisation, en vue de la préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, des oligosaccharides de formule (I) et de ceux de formule (II).

10. Utilisation des produits désignés par I<sub>9</sub> et L<sub>11</sub> et du produit constituant la fraction DP 7 du produit I<sub>9</sub> en vue de la préparation de médicaments pour le traitement des dérèglements de l'apoptose.

1/8

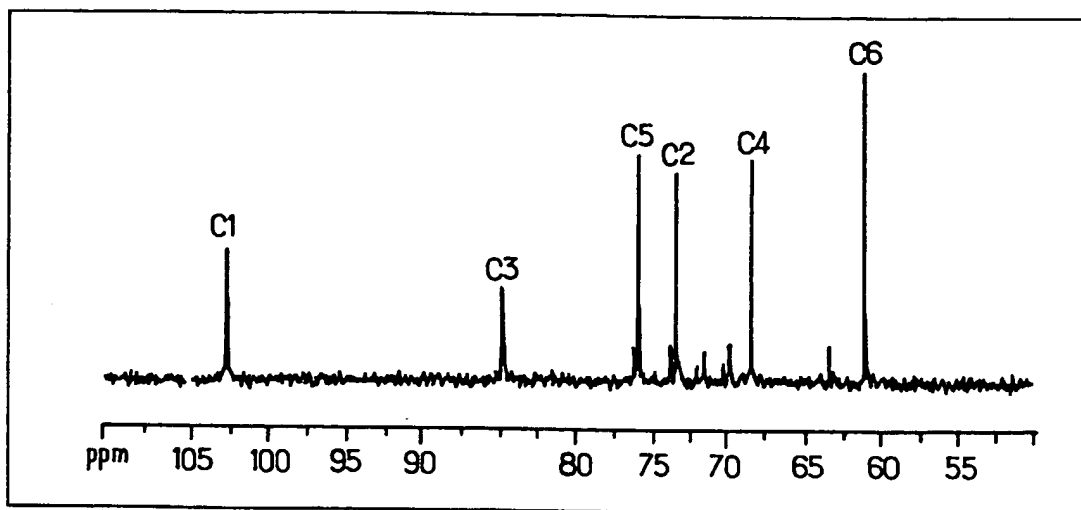


FIG.1.

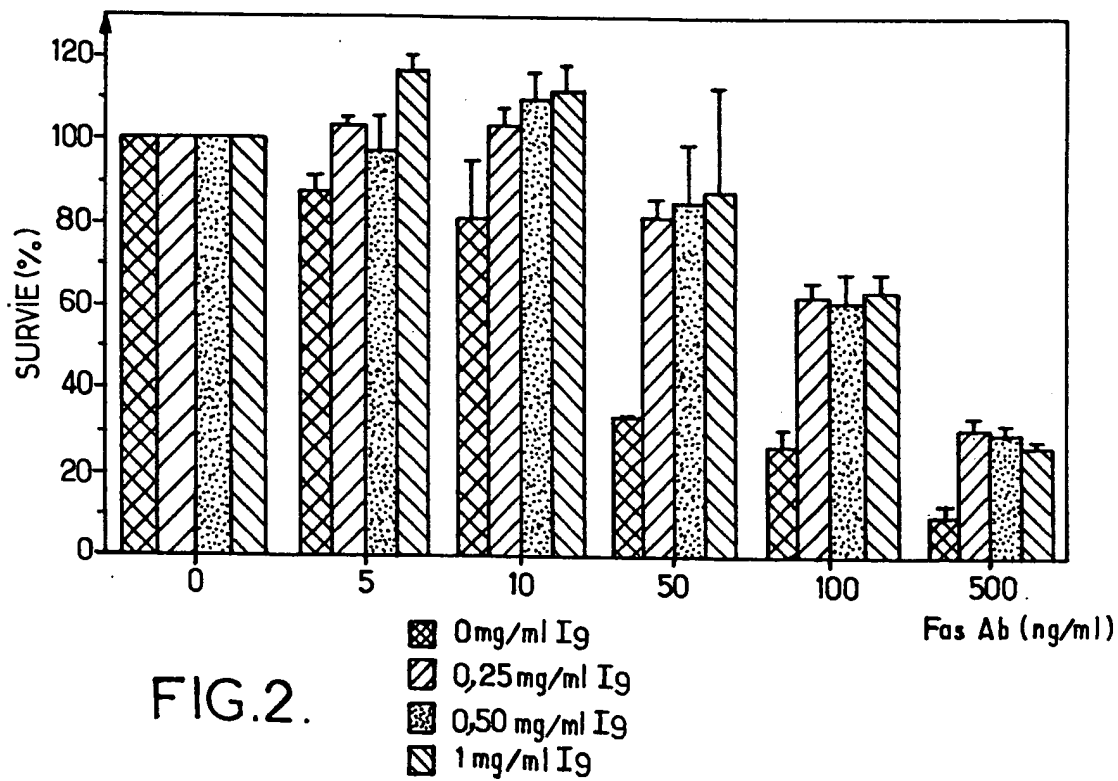
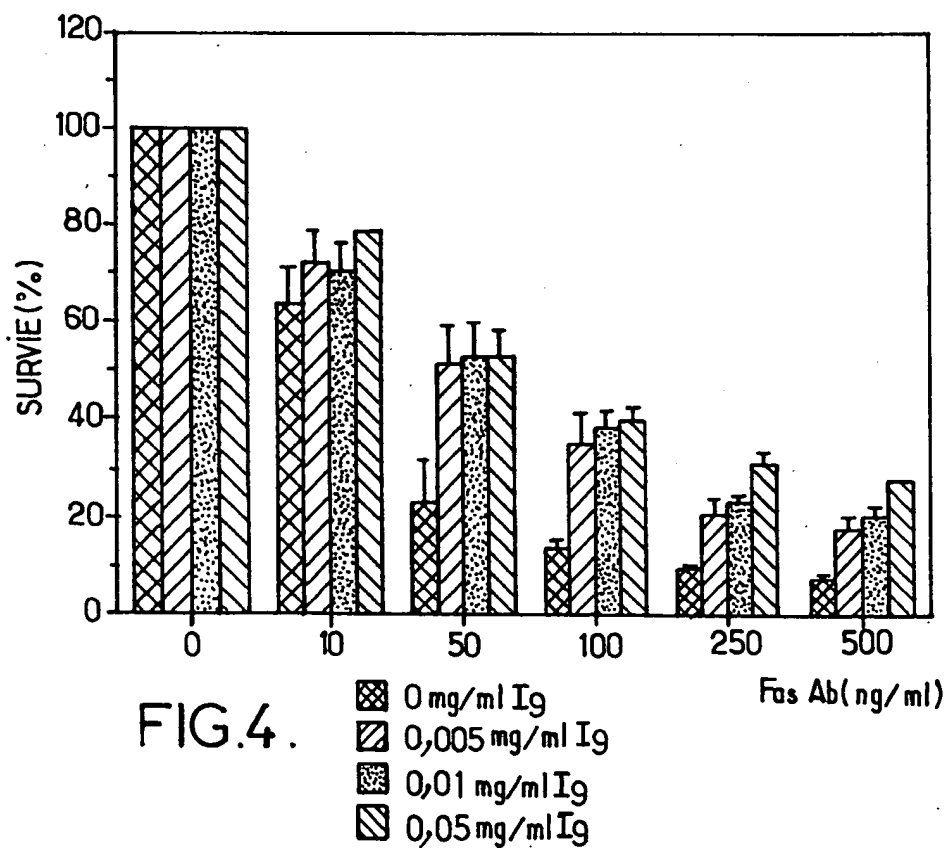
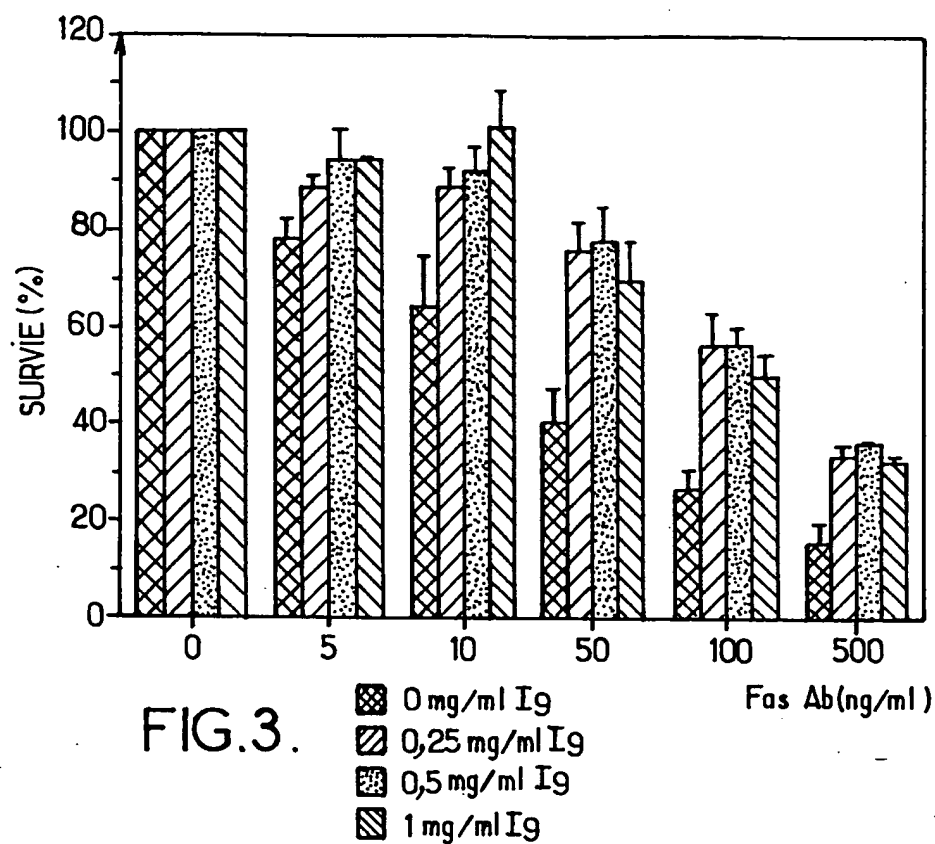


FIG.2.

2/8





3/8

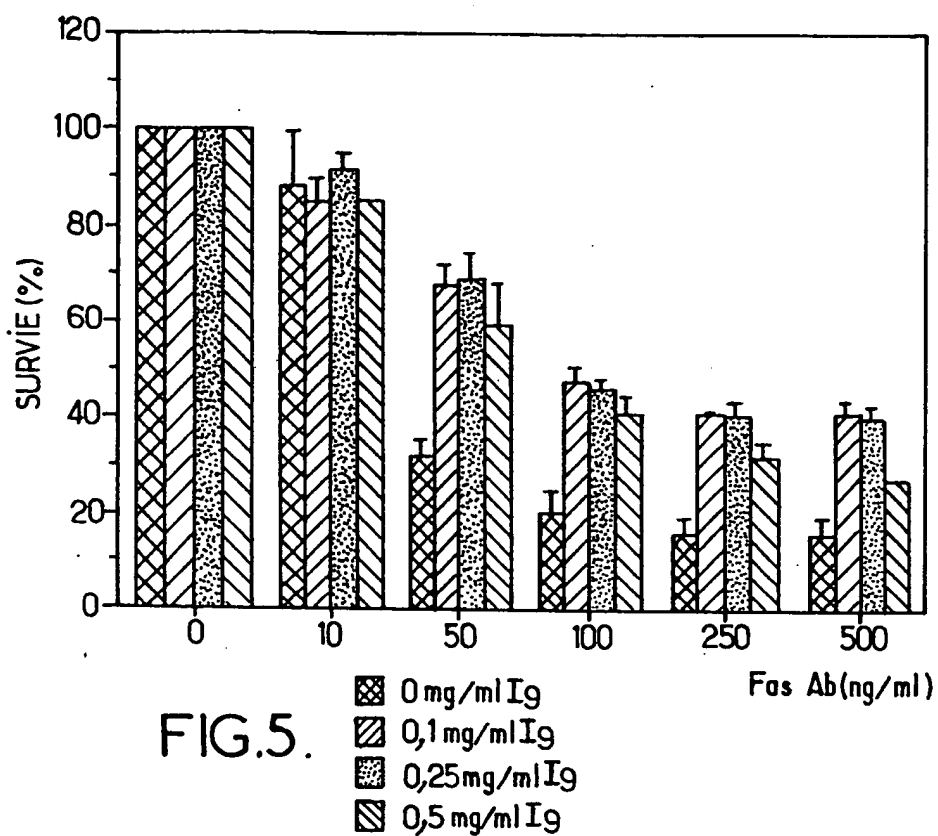


FIG. 5.

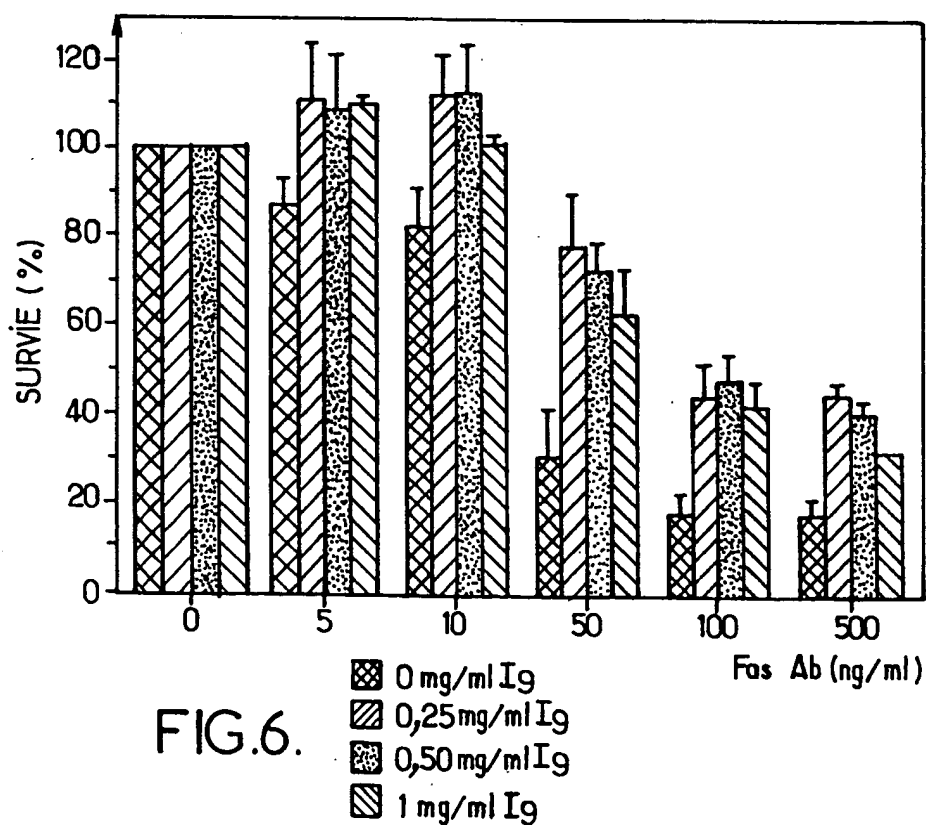


FIG. 6.

4/8

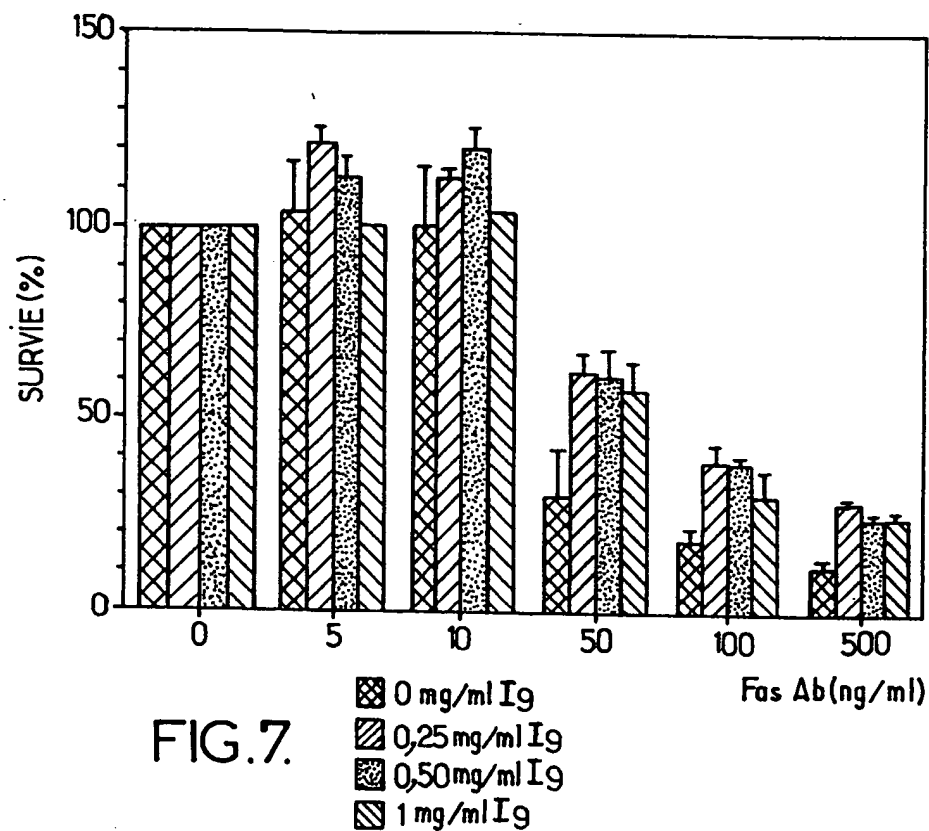


FIG. 7.

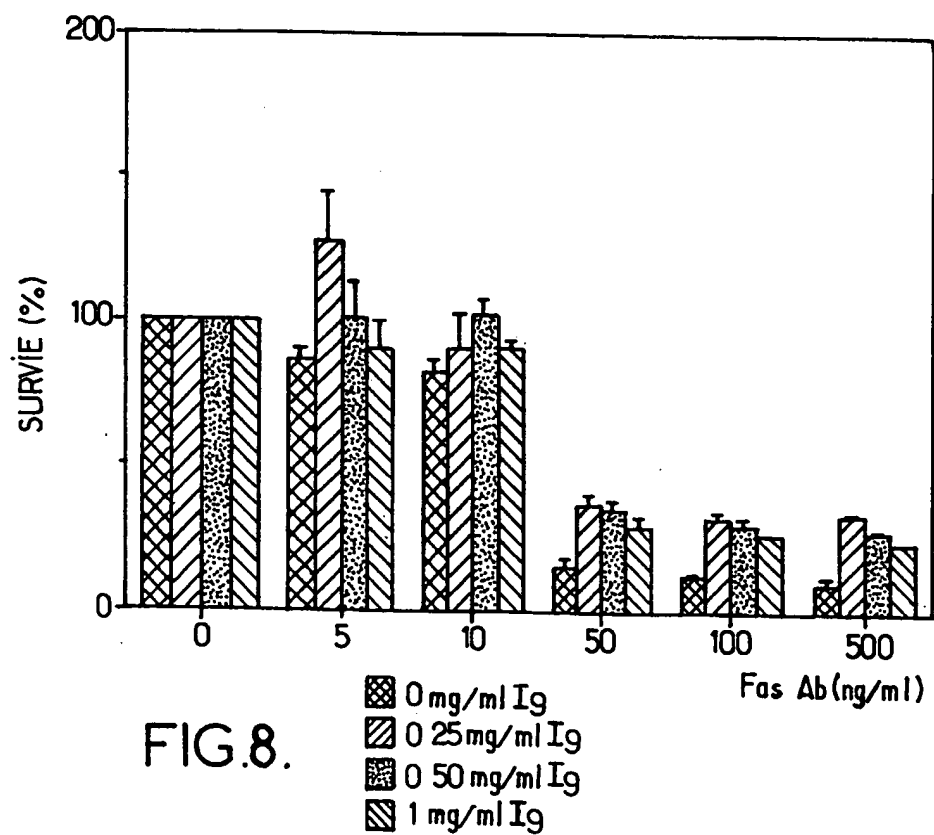


FIG. 8.

5/8

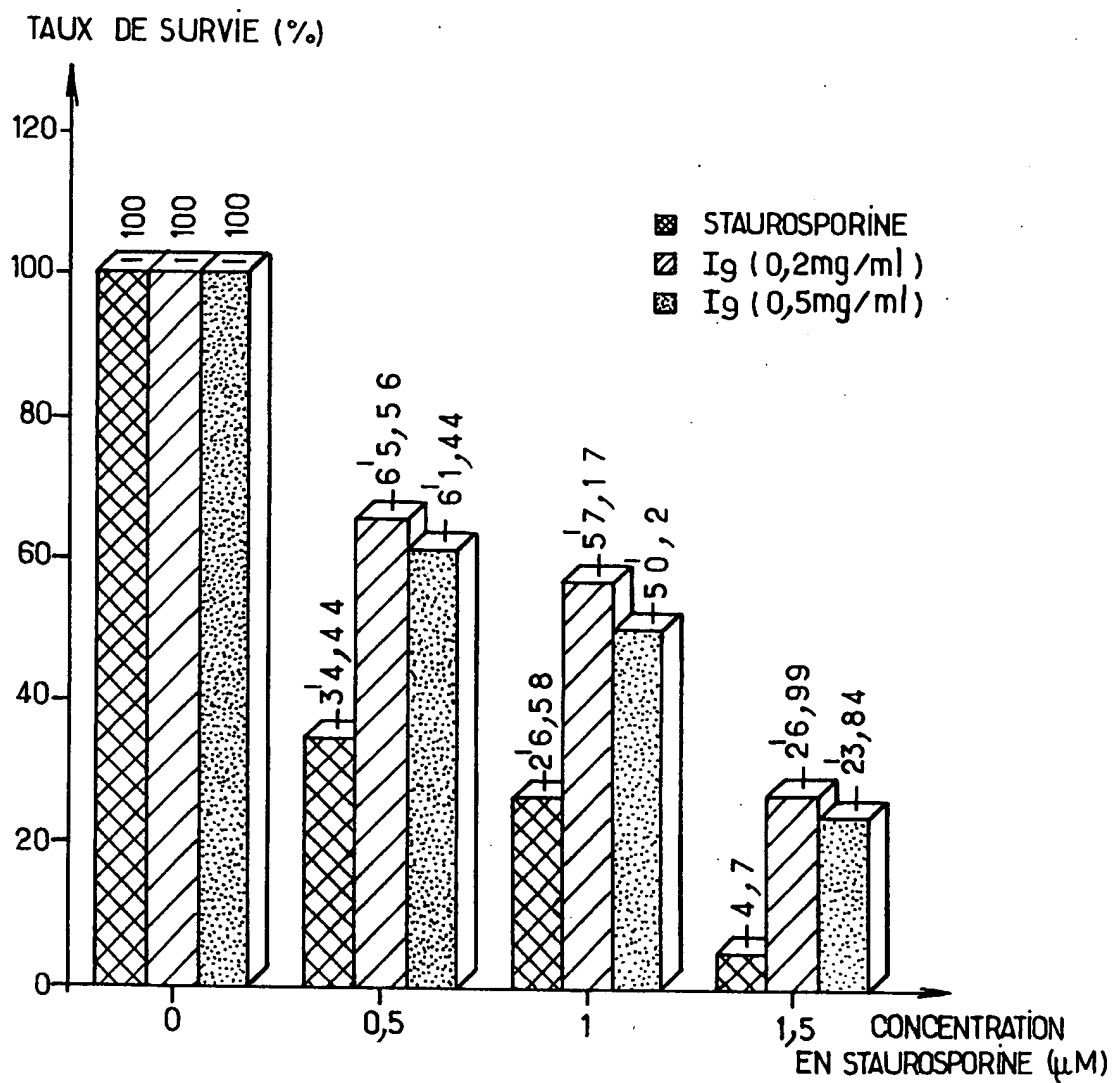


FIG.9.

6/8

FIG.10.

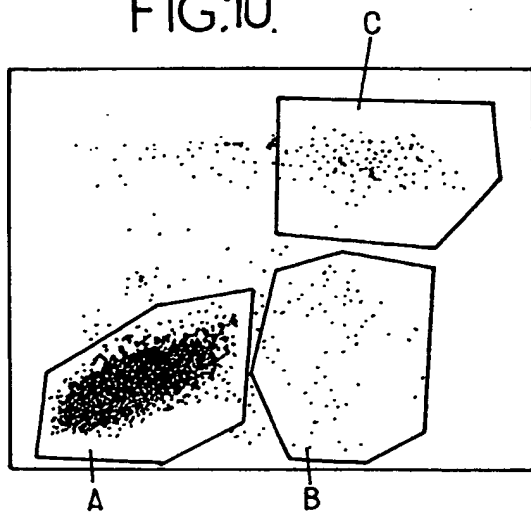


FIG.11.

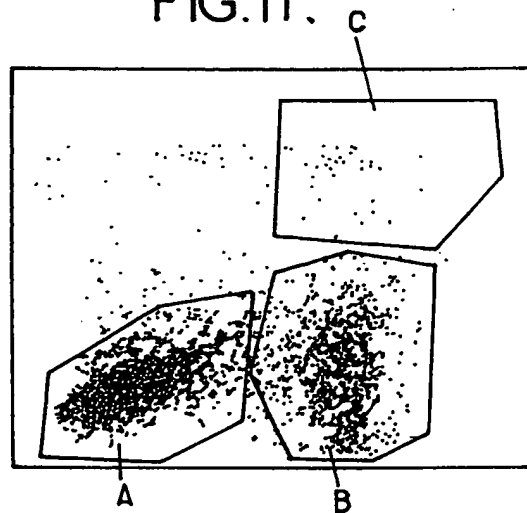


FIG.12.

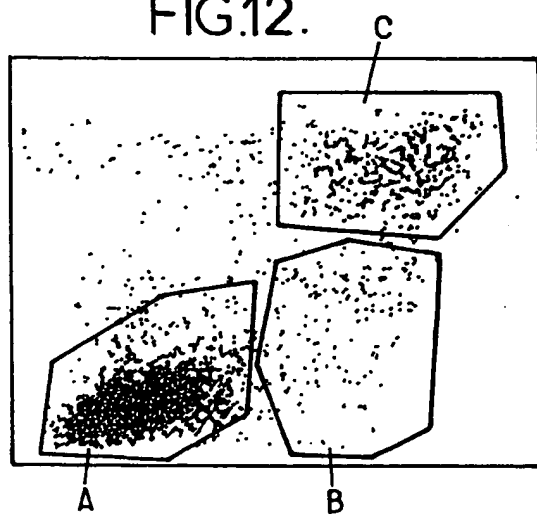
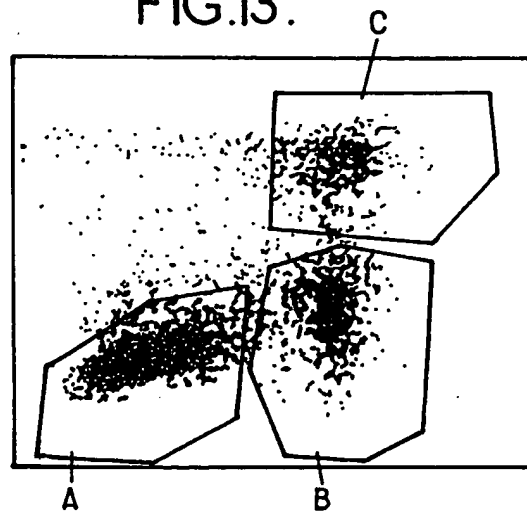
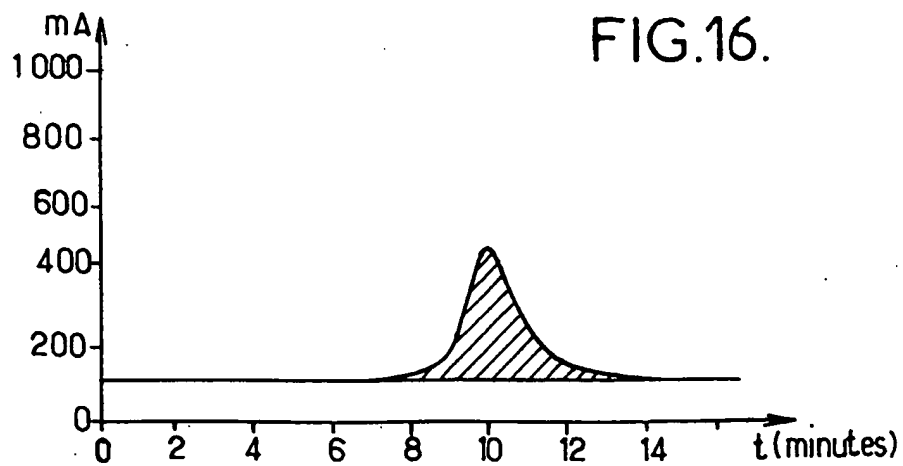
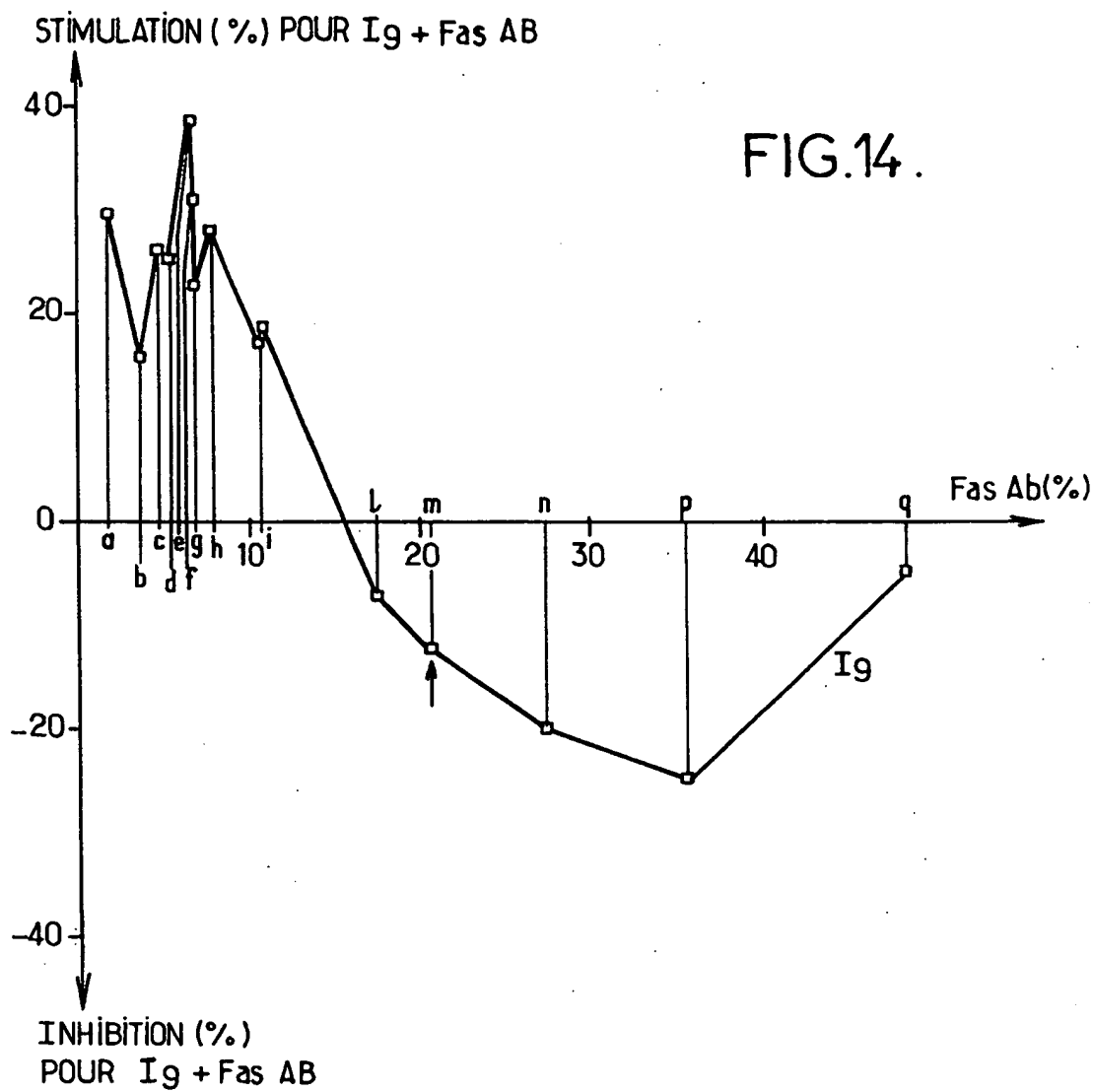


FIG.13.



7/8



8/8

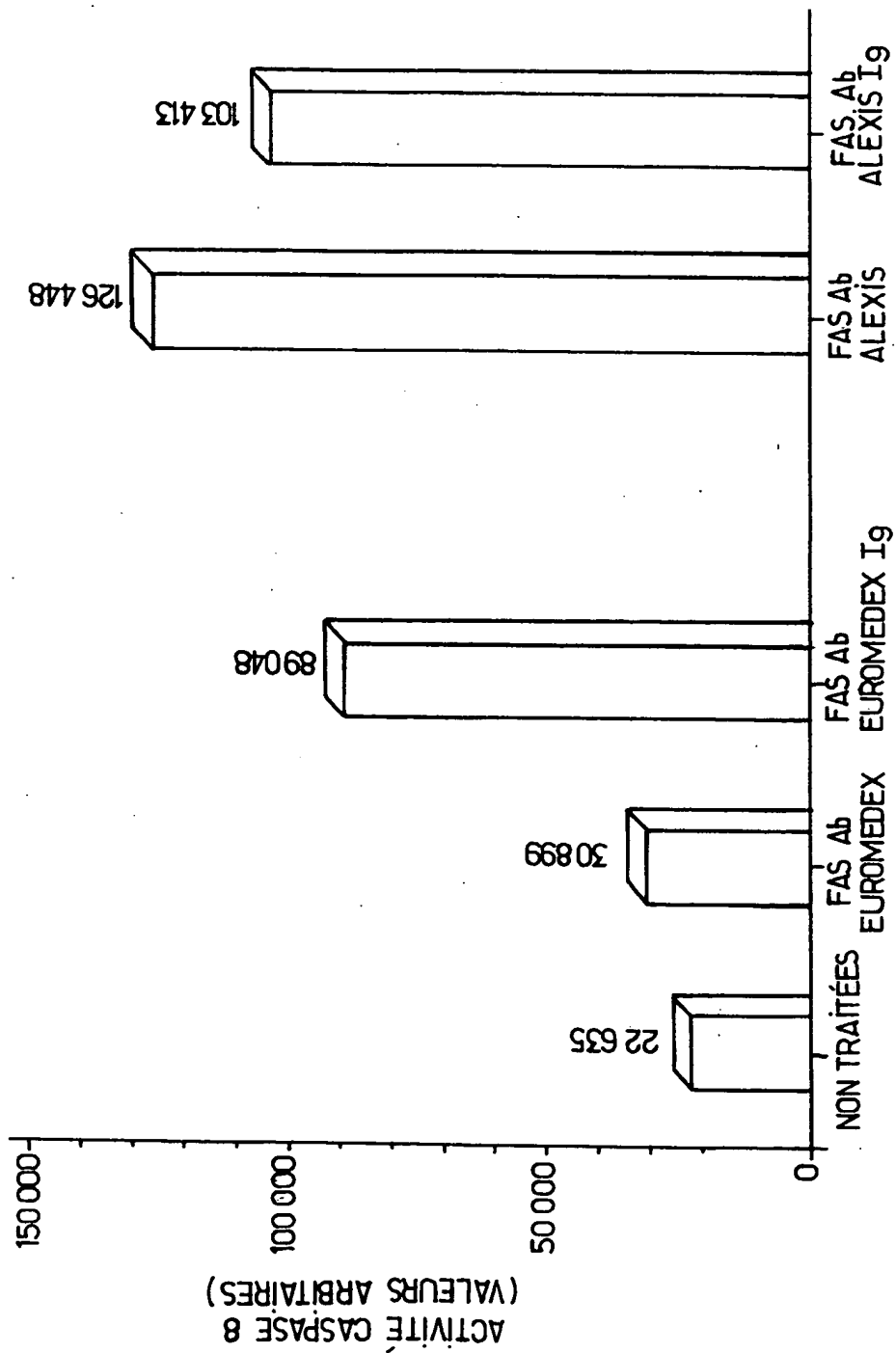


FIG.15.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00229

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 795 560 A (SEIKAGAKU CORP.) 17 September 1997 see claims 21-25	1
A	WO 95 02684 A (LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 26 January 1995 see page 1 - page 5	
A	EP 0 552 373 A (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO.) 28 July 1993 see claims	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 1999

Date of mailing of the international search report

23/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klaver, T

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00229

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 795560	A	17-09-1997	AU 3935695 A	19-06-1996
			CA 2206611 A	06-06-1996
			CN 1174557 A	25-02-1998
			HU 77134 A	02-03-1998
			WO 9616973 A	06-06-1996
WO 9502684	A	26-01-1995	AU 696991 B	24-09-1998
			AU 7336394 A	13-02-1995
			CA 2167282 A	26-01-1995
			CN 1130401 A	04-09-1996
			EP 0776359 A	04-06-1997
			FI 960165 A	26-01-1996
			HU 73100 A	28-06-1996
			JP 9503645 T	15-04-1997
			PL 312586 A	29-04-1996
			US 5834266 A	10-11-1998
			US 5869337 A	09-02-1999
			AU 690898 B	07-05-1998
			AU 6240394 A	29-08-1994
			EP 0804561 A	05-11-1997
			FI 953812 A	11-08-1995
			JP 8510896 T	19-11-1996
EP 552373	A	28-07-1993	AU 648690 B	28-04-1994
			AU 2231792 A	11-02-1993
			WO 9300902 A	21-01-1993
			JP 2628106 B	09-07-1997
			MX 9203950 A	01-05-1993
			US 5672603 A	30-09-1997
			US 5750529 A	12-05-1998
			US 5543412 A	06-08-1996
			US 5658912 A	19-08-1997
			US 5798358 A	25-08-1998
			US 5872120 A	16-02-1999



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar. nternationale No

PCT/FR 99/00229

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 795 560 A (SEIKAGAKU CORP.) 17 septembre 1997 voir revendications 21-25	1
A	WO 95 02684 A (LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 26 janvier 1995 voir page 1 - page 5	
A	EP 0 552 373 A (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO.) 28 juillet 1993 voir revendications	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 mars 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/03/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Klaver, T

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Deman. internationale No

PCT/FR 99/00229

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 795560	A	17-09-1997	AU 3935695 A	19-06-1996
			CA 2206611 A	06-06-1996
			CN 1174557 A	25-02-1998
			HU 77134 A	02-03-1998
			WO 9616973 A	06-06-1996
WO 9502684	A	26-01-1995	AU 696991 B	24-09-1998
			AU 7336394 A	13-02-1995
			CA 2167282 A	26-01-1995
			CN 1130401 A	04-09-1996
			EP 0776359 A	04-06-1997
			FI 960165 A	26-01-1996
			HU 73100 A	28-06-1996
			JP 9503645 T	15-04-1997
			PL 312586 A	29-04-1996
			US 5834266 A	10-11-1998
			US 5869337 A	09-02-1999
			AU 690898 B	07-05-1998
			AU 6240394 A	29-08-1994
			EP 0804561 A	05-11-1997
			FI 953812 A	11-08-1995
			JP 8510896 T	19-11-1996
EP 552373	A	28-07-1993	AU 648690 B	28-04-1994
			AU 2231792 A	11-02-1993
			WO 9300902 A	21-01-1993
			JP 2628106 B	09-07-1997
			MX 9203950 A	01-05-1993
			US 5672603 A	30-09-1997
			US 5750529 A	12-05-1998
			US 5543412 A	06-08-1996
			US 5658912 A	19-08-1997
			US 5798358 A	25-08-1998
			US 5872120 A	16-02-1999